

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-500493

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)1月19日

(51)Int.Cl.<sup>\*</sup>  
C 12 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号  
ZNA A 9453-4B

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全20頁)

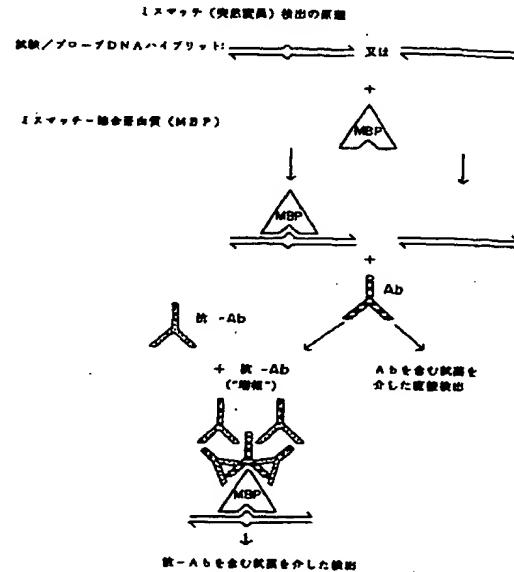
(21)出願番号 特願平5-503014  
(86)(22)出願日 平成4年(1992)7月17日  
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)1月19日  
(86)国際出願番号 PCT/US92/06045  
(87)国際公開番号 WO93/02116  
(87)国際公開日 平成5年(1993)2月4日  
(31)優先権主張番号 732,219  
(32)優先日 1991年7月19日  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,  
SE), AU, CA, JP

(71)出願人 アブステイト・バイオテクノロジー・イン  
コーポレーション  
アメリカ合衆国ニューヨーク州12946レイ  
クブラシド・サラナクアベニュー89  
(72)発明者 ワグナー, ロバート・イー, ジュニア  
アメリカ合衆国ニューヨーク州12989バー  
モントビル・ボックス236・ルート1  
(72)発明者 ラドマン, ミロスラブ  
フランス国75013パリ・アベニューデイタ  
リ 139  
(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

(54)【発明の名称】 突然変異の検出法

(57)【要約】

1個の塩基の変化又は約1-4塩基対の付加あるいは欠失などの突然変異の検出法は、MutSなどのDNAミスマッチ結合蛋白質の利用に基づいており、その蛋白質は1個の塩基ミスマッチ又は不对塩基を有する核酸ハイブリッドに結合し、それによりヌクレオチド配列中に1個の塩基変化のような小さい変化を含む突然変異の検出を可能にする。そのような方法は多様な重要な疾患状態又は罹り易さの診断、例えば突然変異発癌遺伝子の存在の検出に有用である。本方法はPCRに基づく方法の効率に関する利点を共有するが、行うのにもっと簡単で安価である。本発明の方法の実行に有用なキットも提示する。



## 請求の範囲

1. (a) 試料を、標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共に、該ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得る該標的ポリヌクレオチドの突然変異又は非突然変異配列にハイブリッド形成をしてハイブリッドを形成するのに適した条件下でインキュベートし、

(b) 評階(a)で形成されたハイブリッドをミスマッチー結合蛋白質と接触させ、

(c) 評階(b)に結合したミスマッチー結合蛋白質の存在を検出する段階を含み、それによりミスマッチー結合蛋白質の存在の検出が試料のポリヌクレオチドの配列中の突然変異の存在の指標となることを特徴とする、試料中の1本鎖標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列から突然変異を検出する方法。

2. 該ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーがDNAであることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

3. 該ハイブリッド形成パートナー-DNAがcDNAであることを特徴とする、請求の範囲2に記載の方法。

4. 該標的ポリヌクレオチドがDNAであることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

5. 該ミスマッチー結合蛋白質がMu t S蛋白質又はその機能的誘導体であることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

6. 試料がその中に存在する核酸を抽出し、変性させるのに十分な条件に合わせた生物学的試料又は液であることを特徴とする、請求の範囲

## 1に記載の方法。

7. 抽出された該核酸につき、該変性の前に制限エンドヌクレアーゼ切断処理を行うことを特徴とする、請求の範囲6に記載の方法。

8. 該ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを段階(a)の該インキュベートの前に固体担体上に固定することを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

9. 該固体担体がニトロセルロース膜であることを特徴とする、請求の範囲8に記載の方法。

10. 該抽出核酸が抽出可能な標識をされ、該ミスマッチー結合蛋白質に結合することができる第1結合パートナーの追加を含むことを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

11. 該第1結合パートナーが該ミスマッチー結合蛋白質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲10に記載の方法。

12. 該抽出核酸が、該ミスマッチー結合蛋白質に結合でき、抽出可能な標識をされていない第1結合パートナー、及び該第1結合パートナーに結合することができる第2結合パートナーの單離、及び該第2結合パートナーの存在の検出を含むことを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

13. 該第2結合パートナーが該第1結合パートナーに特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲12に記載の方法。

14. 該第2結合パートナーがMu t S蛋白質又はその機能的誘導体であることを特徴とする、請求の範囲12に記載の方法。

15. 該第2結合パートナーがMu t S及び抽出可能な第2蛋白質あるいはペプチドの融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲1に

## 記載の方法。

16. 該第2蛋白質がペーターガラクトシダーゼであることを特徴とする、請求の範囲15に記載の方法。

17. 評階(b)の該ミスマッチー結合蛋白質が抽出可能な第2蛋白質又はペプチドと融合した融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲1に記載の方法。

18. 該抽出段階が該第2蛋白質又はペプチドに結合することができる第2結合パートナーの添加及び該第2結合パートナーの存在の検出を含むことを特徴とする、請求の範囲17に記載の方法。

19. 該第2蛋白質がペーターガラクトシダーゼであることを特徴とする、請求の範囲18に記載の方法。

20. 該第2蛋白質が色素原色素基質からの着色反応生成物の形成を触媒することができる酵素であり、該抽出段階が該色素原色素基質を与えて該着色反応生成物を視覚化することを含むことを特徴とする、請求の範囲17に記載の方法。

21. (a) 試料を、標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共に、該ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得る該哺乳類標的ポリヌクレオチドの突然変異又は非突然変異配列にハイブリッド形成をしてハイブリッドを形成するのに適した条件下でインキュベートし、

(b) 評階(a)で形成されたハイブリッドをミスマッチー結合蛋白質と接触させ、

(c) 該ハイブリッドに結合したミスマッチー結合蛋白質の結合を検

出する段階を含み、それによりミスマッチー結合蛋白質の結合の検出が試料の哺乳類ポリヌクレオチドの配列中の突然変異の存在の指標となることを特徴とする、試料中の1本鎖標的哺乳類ポリヌクレオチドの非突然変異配列から突然変異を検出する方法。

22. その中に1個又はそれより多い容器を与えられるように適合せられ、

(a) 標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも1個の1本鎖塩基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを含む第1容器；

(b) ミスマッチー結合蛋白質を含む第2容器；及び

(c) ミスマッチー結合蛋白質の該ハイブリッドへの結合を検出することができる試薬又は試薬群を含む第3容器あるいは複数の容器を含み、試料中の標的ポリヌクレオチド配列の非突然変異配列から突然変異配列を検出するのに有用なキット。

23. 該ミスマッチー結合蛋白質がMu t S又はその機能的誘導体であることを特徴とする、請求の範囲22に記載のキット。

24. 該試薬又は試薬群がミスマッチー結合蛋白質と結合することができる少なくとも1個の第1結合パートナーを含むことを特徴とする、請求の範囲22に記載のキット。

25. 該第1結合パートナーがミスマッチー結合蛋白質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲24に記載のキット。

26. 該試薬又は試薬群が、該ミスマッチー結合蛋白質に結合でき、抽出可能な標識をされていない第1結合パートナー、及び該第1結合パートナーに結合できる第2結合パートナーを含むことを特徴とする、請求

## 突然変異の検出法

## 背景の説明

- の範囲19に記載のキット。
27. 該第2結合パートナーが該第1結合パートナーに特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲26に記載のキット。
28. 該第1結合パートナーがMu-tシ蛋白質又はその機能的構成体であることを特徴とする、請求の範囲26に記載のキット。
29. 該第1結合パートナーがMu-tシ及び検出可能な第2蛋白質又はペプチドの間の融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲28に記載のキット。
30. 該第2蛋白質がペーターガラクトシダーゼであることを特徴とする、請求の範囲29に記載のキット。
31. 該第2結合パートナーが該Mu-tシ蛋白質又は機能的構成体に結合できることを特徴とする、請求の範囲29に記載のキット。
32. 該ハイブリッド形成パートナーを固体担体上に固定することを特徴とする、請求の範囲22に記載のキット。
33. 該固体担体がニトロセルロース膜であることを特徴とする、請求の範囲31に記載のキット。
34. 該ミスマッチー結合蛋白質が酵素と融合した融合蛋白質であり、該試薬が該酵素のための色素原基質を含むことを特徴とする、請求の範囲19に記載のキット。

試料中の特定の核酸分子の存在を検出できる検定法は、病気の予想及び診断、医学、疫学及び公衆衛生において実質的に重要である。そのような検定法は例えば患者における突然変異遺伝子の存在の検出に用いられることがで、患者が遺伝病に罹る可能性を決定することができる。細胞の発癌遺伝子における個別の突然変異がその発癌遺伝子を活性化し、その細胞を癌細胞に変換し得るという発見と共に、癌の早期発見又は癌に罹り易きの見方に於ける突然変異の検出能力の重要性が増してきた (Nishimura, S. et al., *Biochem. J.*: 243: 313-327 (1987); Bos, J. L., *Cancer Res.*, 49: 4682-4689 (1989))。

核酸検出検定法は、核酸分子の多くの特性、例えばその寸法、配列、側鎖エンドヌクレアーゼにより消化される傾向などのいずれに基づくこともできる。そのような検定法の感度は、検出が報告されるか又は検査者に信号が送られる方法を変えることにより向上させることができる。既って例えば検出可能な標識をした試薬を用いることにより検定感度を向上させることができる。酵素標識 (Kourilsky et al., 米国特許第4, 581, 338号明細書)、放射性同位体標識 (Falkow et al., 米国特許第4, 358, 535号明細書; Berninger, 米国特許第4, 446, 236号明細書)、蛍光標識

(Albarella et al., 歐州特許第144914号明細書)、化学標識 (Sheldon III et al., 米国特許第4, 582, 789号明細書; Albarella et al., 米国特許第4, 563, 417号明細書)、修飾標識 (Miyoshi et al., 歐州特許第119448号明細書)などの多様な標識がこの目的で用いられてきた。

いくつかの検出系が特定の突然変異の検出のために設計され、それはプローブと追加の結合パートナーの組み合わせを含み、後者はレポーターとして働く。Pauw et al., 米国特許第4, 556, 643号明細書は、標的-特異的配列及び蛋白質-結合配列を有するポリクロレオチドプローブを開示している。ほとんどの場合そのような蛋白質-結合配列は、標的-特異的セグメントに連結されたDNAの外部セグメント (extra segment) である。用いられる結合蛋白質は、蛋白質-酵素複合体などの蛋白質-マーカー複合体の一例であることができる (第7、行7-10)。開示されている結合蛋白質はDNA-修飾酵素、ポリメラーゼ、ラクトースリプレッサー又は抗原性DNA配列である (第7、行10-29)。この参照文献に記載されているプローブの典型的例 (実施例1、第12及び13) は、cDNA分子 (標的DNA配列とハイブリッド形成できる) であり、それにT7プロモーター (蛋白質結合配列) が連結されている。このプローブのハイブリッド形成の後にE. コリ (*E. coli*) RNAポリメラーゼが結合蛋白質として加えられ、T7プロモーターに結合する。結合したRNAポリメラーゼの存在は、ポリメラーゼに特異的なウサギ抗血清、及びその後バーオキシダーゼ複合化ヒツジー抗ウサギ第2抗体、ならびにバ

ーオキシダーゼ-抗バーオキシダーゼ検出系により検出される。

Mundy, 米国特許第4, 656, 127号明細書は、特定のヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法を開示しており、それは問題の領域の配列がわかつていることが必要であり (第1、行52-43)、突然変異が制限部位になくとも良いという利点を有する。突然変異の部位から1方向に延びる核酸鎖の一部に相補的な直鎖状プローブが開示されている。ハイブリッド形成の後に、特定の塩基配列が存在するか不在かに依存してプローブの末端に結合するヌクレオチド構成体が加えられる。1本鎖部分は消化される。その後プローブの存在又は不在が検出される (第2、行3-22)。参照文献ではヌクレオチド構成体としてチオヌクレオチドが考えられており (第4、行46-51)、それは検出可能な標識をすることにより検出される。

Kato et al., 歐州特許公開第407, 789号明細書は、標識プローブを用いたハイブリッド形成に基づく核酸の検出法を開示している。非放射性標識の中に、ビオチン-アビシン系を用いた酵素及び蛍光が挙げられている (第2、行36-39)。標識の例はビオチン-標識dUTPであり、合成によりプローブ中に導入される。

核酸ハイブリッドにおけるミスマッチ塩基対の検出のために設計された多くの方法が当該技術分野において既知である。初期の方法はミスマッチの酵素切断に基づいていた (Gibbs, R. et al., *Science* 236: 303-305 (1987))。これらの方法はミスマッチDNAハイブリッドを酵素により切断する段階を含む。これらの方法の欠点の1つは、すべてのミスマッチを確実には検出しないことである。最近記載されたミスマッチDNAの切断のための化学的方法

(Cotton, R. G. et al., Proc. Natl. Sci. USA 85: 4397-4401 (1988); Cotton, R. G., Nuc. Acids Res. 17: 4223-4233 (1989)) は多くの試験、特に四酸化オスミウム及びヒドロキシルアミンを用いたDNA-DNAヘテロ2本鎖におけるミスマッチ部位の化学的切断に基づく。この方法の場合、DNAプローブは標識のDNAの制限酵素切断により修飾される。問題の配列を含むプラスミドDNAを標識プローブDNA (<sup>32</sup>Pを用いた末端ラジオ活性基又は内部標識) にハイブリッド形成させる。ヒドロキシルアミンはミスマッチしたシトシンを化学的に修飾し、四酸化オスミウムはミスマッチしたチミンを修飾する。その後ビペリジンを用いて修飾部位でDNAを切断し、続いてポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE) 及びオートラジオグラフィーを行い、切断生成物を同定する。この方法は、ミスマッチに特異的な正常な塩基対での切断も生ずるので、すべての可能な1箇のミスマッチ塩基対を検出するという利点を有すると謂われている。

Caskey及び共同研究者等は突然変異の位置決定の方法を開示しており、それはミスマッチ切断反応のための酵素としてPCR増幅cDNAを用いる。この方法はオルニチントランスクカルバモイライザーゼ(OTCase)欠乏症患者の研究で突然変異のマッピングに適用された。

Kung et al., 米国特許第4, 963, 658号明細書は、高親和性ssDNA-結合蛋白質、例えばトポイソメラーゼ又はそれ自身が標識に結合できるDNA巻戻し蛋白質(第2、行44-47)、例えばB-D-ガラクトシダーゼ(図7、行1)との結合による、1本鎖

DNA(ssDNA)の検出につき開示している。

現在利用できる検定法の用途及び適用性を増す限りは多くの場合、感度ならびに複雑性及び経費により失敗してきた。従ってより感度が高く、簡単で、比較的安価な、DNAにおける変異の検出のための検定法の開発が非常に望まれている。

#### 発明の概要

本発明は配列中に1塩基の変化のような小さい変化を含む性状配列の突然変異を検出する方法に関する。試料中に標的ポリヌクレオチドが存在する程度も検定することができる。本方法はE. コリ及びサルモネラ(Salmonella)のMut S蛋白質を例とするミスマッチ-結合蛋白質の利用に基づいている。本明細書で用いられる標的ポリヌクレオチドという用語は検出されるべき核酸配列である。突然変異を含まない標的ポリヌクレオチド配列(非変形態)は、非突然変異標的ポリヌクレオチド又は非突然変異標的配列と謂われる。突然変異又は変異を含む標的ポリヌクレオチド配列は、突然変異標的ポリヌクレオチドと謂われる。本方法は、例えば突然変異免疾遺伝子の存在を検出することにより、多様な重要疾患状態又は罹り易さを診断するのに有用である。方法はPCRに基づく方法の効率に関する利点を共有するが、実施することがもっと簡単で安価である。発明者等は本発明の方法を行うためのキットの考案も行った。

分析するDNAは血液細胞、精子又は生物、好ましくはヒトの組織から得たDNAなどのいずれの種類であることもできる。本発明の方法はPCRで用いられるような精巧な、又は高価な装置を必要とせず、洗練された訓練なしで技術者が行うことができる。方法は、試験試料及び標

準DNAに同一の処理が行われるように内部制御することができる。最後に方法は、例えば膜フィルター上の着色“プラス”又は“マイナス”的印などの、簡単で解釈の容易な結果を与えるように設計することができる。

本発明は2つの重要要素に基づいている。第1は既対合又は非対合塩基を含む塩酸ヘテロ2本鎖に結合する蛋白質の存在である。そのようなミスマッチ-結合蛋白質の周知の例はバクテリア蛋白質、例えばDNA修復において機能するE. コリのMut S蛋白質である。第2の要素は特定の遺伝子及びその突然変異対立遺伝子の単離及び配列決定が比較的容易であることがある。

かくして本発明は、試料中の1本鎖ポリヌクレオチド(又は標的ポリヌクレオチド)の配列中に突然変異が存在するかどうかを決定する方法を目的とする。すなわちそれは突然変異標的ポリヌクレオチドの検出、あるいはポリヌクレオチド(DNA又はRNA)中に突然変異が存在(又は不在)するかどうかの決定の方法である。

方法において、突然変異標的ポリヌクレオチドに関して分析される試料は、非突然変異標的ポリヌクレオチドの配列と相補的な少なくとも1箇の1本鎖塩基配列である1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共にインキュベートされる。ハイブリッド形成パートナー及び、突然変異標的ポリヌクレオチドに関して評価されるポリヌクレオチド(例えばDNA又はRNA試料)は、ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得るいずれの突然変異又は非突然変異標的ポリヌクレオチドともハイブリッド形成するために適した条件下でインキュベートされる。相補的配列がハイブリッド形成すると、ハイブリッド形成パート

ナーと標的ポリヌクレオチドのハイブリッドが形成される。形成されたハイブリッドを、ミスマッチ-結合蛋白質が突然変異標的ポリヌクレオチドに結合するのに適した条件下で、ミスマッチ-結合蛋白質と合わせる、又は接触させる。これによりミスマッチ-結合蛋白質が、標的ポリヌクレオチドが突然変異標的ポリヌクレオチドであるハイブリッドに結合することになる。ハイブリッドに結合したミスマッチ-結合蛋白質の存在の検出は、試料中のポリヌクレオチドの配列中に突然変異が存在することを示す(すなわち突然変異標的ポリヌクレオチドの存在を示す)。

上記において、ハイブリッド形成パートナーはDNA、例えばcDNA又は合成オリゴヌクレオチドであることが好ましい。標的ポリヌクレオチドはDNA又はRNAであることができる。好ましいRNAはmRNAである。

上記の方法で、好ましいミスマッチ-結合蛋白質はMut S蛋白質あるいはその他の標的的構成体である。

方法の最後の1つにおいて試料は、存在するいずれの塩酸も放出し、変性する(1本鎖とする)のに十分な状態に至わせた生物学的液体である。場合により放出された塩酸につき、変性の前に制限エンドヌクレアーゼ切断の段階を行なう。

ある懸念の場合、ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを固体担体上に固定し、得られた固体担体-結合ハイブリッド形成パートナーを突然変異標的ポリヌクレオチドの存在に関して評価されるべきポリヌクレオチドの試料と共にインキュベートする。好ましい固体担体は二クロセルロース膜である。

検出段階は、ミスマッチ-結合蛋白質と結合する検出可能な標識をし

## 特表平7-500493 (5)

た第1結合パートナーを加えることを含むのが好ましい。第1結合パートナーは例えばミスマッチャー結合蛋白質に特異的な抗体、又は検出される着色反応生成物の形成を触媒する酵素であることができる。

他の様の場合、検出段階はミスマッチャー結合蛋白質と結合し、検出可能な標識をされていない第1結合パートナー、及び第1結合パートナーと結合する第2結合パートナーを加え、第2結合パートナーの存在を検出することを含む。第2結合パートナーはそれ自身検出可能な標識をされていることができ、又は第2結合パートナーに結合する検出可能な標識をされた第3結合パートナーを用いることもできる。好ましい第2結合パートナーは第1結合パートナーに関する抗体である。他の様の場合、第2結合パートナーはMu-LI蛋白質又はその機能的構成体、好ましくはMu-LIと検出可能な第2蛋白質又はペプチドの間の融合蛋白質である。融合蛋白質における好ましい第2蛋白質はベーターガラクトシダーゼである。

他の様の場合、ミスマッチャー結合蛋白質は融合蛋白質の1成分であり、その第2成分は直接（すなわちそれ自身が検出可能）又は間接的に（すなわち検出可能な試薬を用いて）検出することができる第2蛋白質又はペプチドである。この様の場合、検出段階は融合蛋白質中に存在する第2蛋白質又はペプチドと結合する、検出可能な標識をした結合パートナーを加えることを含むのが好ましい。第2蛋白質は色素原基質からの着色反応生成物の形成を触媒することができる酵素であることができる。検出段階は、色素原基質を与えて着色反応生成物を視覚化することを含む。好ましい第2蛋白質はベーターガラクトシダーゼである。

本発明はさらに、試料中の1本鎖側的哺乳類ポリヌクレオチドの非突

(b) ミスマッチャー結合蛋白質を含む第2容器；及び

(c) ミスマッチャー結合蛋白質のハイブリッドへの結合を検出することができる試薬又は試薬を含む第3容器あるいは複数の容器。

上記のキットにおいて、ミスマッチャー結合蛋白質はMu-LI又はその機能的構成体が好ましい。試薬又は試薬群は、ミスマッチャー結合蛋白質に結合することができる検出可能な標識をされた第1結合パートナーを少なくとも1個含むのが好ましい。好ましい第1結合パートナーはミスマッチャー結合蛋白質に特異的な抗体である。

キットの別の様の場合、試薬又は試薬群は検出可能な標識をされていない第1結合パートナーを含み、第1結合パートナーはミスマッチャー結合蛋白質と結合することができ、抗体などの第2結合パートナーが第1結合パートナーに結合することができる。第2結合パートナーは検出可能な標識をされていることができる。第2結合パートナーが標識されておらず、第2結合パートナーに結合することができ、検出可能な標識をされた第3結合パートナーを含むキットも意図されている。

好ましいキットの様の場合、第1結合パートナーはMu-LI蛋白質又はその機能的構成体、例えばMu-LIと検出できる第2蛋白質又はペプチド、好ましくはβ-ガラクトシダーゼの間の融合蛋白質である。第2結合パートナーはMu-LI蛋白質又はその融合パートナー蛋白質に結合することができ、例えばβ-ガラクトシダーゼに特異的な抗体である。

上記のキットにおいて、ハイブリッド形成パートナーは固体担体上に固定されているのが好ましい。好ましい固体担体はニトロセルロース膜である。

キットの他の様において、ミスマッチャー結合蛋白質は酵素と融合し

検定配列から突然変異配列を検出（区別）する方法を目的とする。この方法では既知の方法を用いて哺乳類ポリヌクレオチドの試料（DNA又はRNA）を得る。例えばDNA又はRNAを細胞から得、それを処理して1本鎖とし、非突然変異側的哺乳類ポリヌクレオチドの配列と相補的である少なくとも1つの1本鎖復基配列である1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共にインキュベートすることができる。DNA又はRNA及びハイブリッド形成パートナーを、ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得るいずれの突然変異又は非突然変異側的ポリヌクレオチドともハイブリッド形成するために適した条件下でインキュベートする。相補的配列がハイブリッド形成すると、ハイブリッド形成パートナーと標的ポリヌクレオチドのハイブリッドが形成される。形成されたハイブリッドを、標的ポリヌクレオチドが突然変異側的ポリヌクレオチドであるハイブリッドとミスマッチャー結合蛋白質が結合するのに適した条件下で、ミスマッチャー結合蛋白質と合わせる、又は接触させる。ハイブリッドに結合したミスマッチャー結合蛋白質の存在の検出は、試料の哺乳類ポリヌクレオチドの配列中に突然変異が存在することを示す（すなわち突然変異側のポリヌクレオチドの存在を示す）。

本発明は試料中の突然変異側のポリヌクレオチドの検出（非突然変異側のポリヌクレオチド配列からの突然変異側のポリヌクレオチドの区別）に有用なキットを含む。キットは以下を含む：

(a) 標的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的（すなわち非突然変異側のポリヌクレオチドに相補的）な少なくとも1個の1本鎖復基配列を含む1本鎖ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを含む第1容器；

た融合蛋白質であり、試薬は酵素に関する色素原基質を含む。

### 図版の簡単な説明

図1はオリゴヌクレオチドの形態のハイブリッド形成パートナー又はcDNAハイブリッド形成パートナーの、試薬又は“標的”DNAとのハイブリッド形成を示す略図である。図の下部はミスマッチ含有ハイブリッドの形状を示す。cDNAがゲノムDNAフラグメントとハイブリッド形成した場合、ゲノムDNAの非ハイブリッド形成部分（インtron）は理屈に突き出ることが示されている。

図2は本発明の突然変異検出検定の略図である。この特定の様の場合、ミスマッチャー結合蛋白質の存在は、ミスマッチャー結合蛋白質に特異的な抗体である第1結合パートナーを用いて検出される。この抗体は検出可能な標識をされることができ、又は検出可能な標識をされた試薬により検出されることができる（右下）。代わりに検出段階は第2結合パートナー、この場合第1抗体に特異的な抗体（“抗-A<sub>b</sub>（Antibody）”）を用いて増幅することができる（左下）。

図3は実地例に記載されている特定の検定型式の略図であり、この場合正及び負の標準がニトロセルロースフィルター上に置かれており、ミスマッチが存在しない場合に目に見える“マイナス”的印が押され、標的DNAが突然変異（ミスマッチ）を含む場合に目に見える“プラス”的印が押される。

図4は溶液中でアニールされたヘテロ2本鎖におけるミスマッチ検出の結果を示す。

図5は固定オリゴヌクレオチドにアニールされたヘテロ2本鎖におけるミスマッチ検出の結果を示す。

特表平7-500493 (6)

Natl. Acad. Sci. USA 83: 5057-5061 (1986); Dohert, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 503-505 (1985); Choy, H. E. et al., Mutat. Res. 142: 93-97 (1985); Jones, M. et al., Mol. Gen. Genet. 184: 562-563 (1981)。サルモネラ チフィムリウム (Salmonella typhimurium) のMutS (Lu, A. L. et al., Genetics 118: 583-600 (1988); Haber, L. T. et al., J. Bacteriol. 170: 197-202 (1988); Pang, P. P. et al., J. Bacteriol. 163: 1007-1015 (1985)) 及びストレプトコックス ニューモニアエ (Streptococcus pneumoniae) のhexA蛋白質 (Priebe, S. D. et al., J. Bacteriol. 170: 190-196 (1988); Haber et al., 同上) を含む類似の蛋白質が他のバクテリア種で既知である。

特異MutS蛋白質はミスマッチ修復を含むDNAと結合するが、ミスマッチを含まないDNA、又は1本鎖DNAに結合しない。MutS-DNA相互作用はDNAの分解又は改変を生じない。

本方法は、突然変異DNAの鎖と野生型DNAの“相補的”鎖がハイブリッド形成した場合に形成されるミスマッチDNAヘテロ2本鎖の検出に基づいている(図1を参照)。ミスマッチの存在は、最初にMutS蛋白質E、コリなどのミスマッチ結合蛋白質をDNA 2本鎖と結合させることにより、特異性の高い方法で検出することができる。結合し

たミスマッチ結合蛋白質の存在を、その後多くの方法のいずれか1つを用いて、例えばミスマッチ結合蛋白質に特異的であり、検出可能な標識をした抗体、例えば抗-MutS抗体を用いることにより検出する。この方法は、ミスマッチ塩基対にて、又はその近辺でDNAを破壊することができるミスマッチ切断ヌクレアーゼ酵素を用いる先行技術の方法と対照的に、そのまま保つ。この方法の概略に関して、図2を参照せよ。

本発明の方法により、試料中の検定の“標的”核酸分子又はポリヌクレオチドの存在を検出することができる。そのような試料は典型的に生物試料、例えば血液、精子、便、血液、尿、唾液、等地など、ならびに非生物試料、例えば海水又は飲料水、牛乳あるいは他の動物、空気などである。

本発明の方法により検出される標的ポリヌクレオチド又は核酸分子はDNA又はRNAであることができるが、DNAが好み。ハイブリッド形成パートナーがcDNAの場合、標的核酸はDNA又はmRNAであることがで、mRNAがより高いコピー数で存在する。本明細書で用いられる“標的核酸”、“標的ポリヌクレオチド”又は“標的配列”という用語は、検出及び/又は定量されるべき問題の配列を含む核酸を言う。それは野生型配列を含むこともでき、その場合それは野生型又は非突然変異型のポリヌクレオチドあるいは非突然変異型の配列と言われる。別の場合はそれは改変又は突然変異(野生型から突然変異した)を含むことができ、その場合それは突然変異型のポリヌクレオチドと言われる。標的核酸における標的配列は、ポリヌクレオチド内に改変又は突然変異が存在してもプローブDNA(ハイブリッド形成パートナー)とハイブリッド形成するのに十分な長さでなくてはならない。標的配列は、

本方法により検出されるために30塩基より大きいことが好み。塩基の1つの場合、ミスマッチ結合蛋白質の結合及びそれに続く検出ができるために、標的配列に関する必要なミスマッチを含む配列を有する“ハイブリッド形成パートナー”ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの構造を可能にするために、標的ヌクレオチド配列が既知でなければならない。

他の態様の場合、cDNA分子がハイブリッド形成パートナーとして用いられる。この場合、標的ヌクレオチド配列をあらかじめ知る必要はない。ゲノムDNAフラグメントとcDNAがハイブリッド形成すると、cDNA中に考えられていないイントロンが不对ループを形成し(図1を参照)、これはミスマッチ結合蛋白質が検出されないし、1個の塩基不対又は1-4塩基対の付加又は欠失によって起きたミスマッチにミスマッチ結合蛋白質が結合するのを防げもない。

本発明の方法は、多くにより最近寄寓された突然変異検出検定で共通に必要な、突然変異型の核酸分子の増幅を必要とせずにそのような分子(DNA又はRNA)を検出することができるという利点を有する。本発明は、1個又はそれより多い野生型標的ヌクレオチド配列に相補的な配列を有する、cDNA分子を含む1個又はそれより多いハイブリッド形成パートナー又はオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド分子の構造及び利用によりこの目標を達成する。ハイブリッド形成パートナーは標的核酸分子とハイブリッド形成することができ、塩基対のミスマッチ又は不对塩基が起こった場合、このミスマッチ又は不对塩基がミスマッチ結合蛋白質により認識される。

好みの態様の場合、ハイブリッド形成パートナーは1本鎖核酸分子

特表平7-500493 (7)

であり、1本鎖DNAが最も好みしい。

標的核酸分子は、例えば真核細胞、原核細胞、ウィルス、ウイロイドなどからのDNA又はRNAであることができる。標的核酸分子は哺乳類起源のものが好ましく、ヒト起源のものが最も好みしい。実際は“標的”核酸分子のヌクレオチド配列又は起源に制限はない。

付加又は欠失の小さなフレームシフト突然変異も、ミスマッチ結合蛋白質が結合するような方法で野生型配列と対応する配列を生ずる。例えばE. コリMut Sに基づく修復系(Radman, M. *et al.*, Annu. Rev. Genet. 20: 523-538 (1986))及びストレプトコックス ニューモニアエ H<sub>6</sub>Xミスマッチ修復系の両方共、1個の塩基の付加又は欠失から生ずるミスマッチに作用することが知られている。2又は3個の塩基対、ならびに程度は少ないが4個の塩基対の付加又は欠失も修復されるが、5個の塩基対の付加又は欠失は修復されない。従って本発明の方法は1-4個の塩基対の小さな付加又は欠失突然変異の検出に有用である。

2本鎖(da)DNA中の特定の1個の塩基の突然変異を検出する検定の場合、2個の突然変異DNA鎖のそれぞれに1個の塩基を抜いて相補的である2個の野生型ハイブリッド形成パートナー配列を用いるのが、1個のハイブリッド形成パートナーのみを用いた場合と比較して検定の感度が2倍に向上的で好みしい。しかし検定は十分感度が良く、感度が2分の1に低下(2個のハイブリッド形成パートナーを用いる場合に比較して)しても本方法の有用性は低下しないので、2個のDNA鎖の1個のみに相補的な1個のハイブリッド形成パートナー配列を用いることもできる。

Bio J. 21: 101-141 (1978)により開示されている。別の場合RNAハイブリッド形成パートナーは、細胞の天然の産物として、例えばmRNA分子として単離することができる。RNA又はcDNAハイブリッド形成パートナーは組み替えDNA法によって調製することができる。(例えばGreen *et al.*, Cell 32: 681 (1983)を参照)。DNAハイブリッド形成パートナーは当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる多様な供給源のいずれからも、例えば天然に存在するDNAの制限エンドヌクレアーゼ切断又は化学的切断により調製することができる。

E. コリMut Sが16塩基のヘテロ2本鎖に結合し(Jiricny *et al.*, 同上)、フットプリント法でMut Sにより認識されるヘテロ2本鎖の大さきが8-12塩基程の小ささである(Su, S-S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5057-5061 (1986))ことを考慮すると、本発明のハイブリッド形成パートナーの大さきの下限は約10ヌクレオチドである。合成経費を安く保ちながらハイブリッド形成の忠実度を増すために、より大きなハイブリッド形成パートナー、好みしくは約20-約100ヌクレオチドが好みしい。オリゴヌクレオチド合成の経費を考慮し、より好みしいオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーは約20-約40ヌクレオチドを有する。本明細書に記載する組み替え法を創造的に用いることができるので、ハイブリッド形成パートナーの大さきに上限はない。従って別の態様の場合、cDNA分子そのままがハイブリッド形成パートナーである。

本発明の方法で用いるために、ハイブリッド形成パートナー配列は認

識すればMut Sなどのミスマッチ結合蛋白質はすべての可能なミスマッチに早い効率で結合しないので(Dohet, C. *et al.*, 1985, 同上; Jones, M. *et al.*, 1987, 同上)、ある種の標的配列の場合には問題の領域における両鎖に相補的なハイブリッド形成パートナーを調製し、与えられたdaDNA野生型配列から2個の可能なミスマッチの両方を形成して2個の突然変異の少なくとも1個を検出することが必要である。

ハイブリッド形成パートナーは、1個より多い塩基対がミスマッチしているより大きな標的配列に相補的な1個の遺伝したポリヌクレオチドセグメントであることができる。別の場合、標的DNAの1個のフラグメント上で約30塩基か又はそれ以上隔てられた2個の突然変異を、それが1個の標的フラグメント上の別の配列とハイブリッド形成する2個か又はそれ以上の個別のハイブリッド形成パートナーを用いて検出することができる。

他の1つにおいて、標的配列に相補的なハイブリッド形成パートナーの領域は、ハイブリッド形成可能部分がその中でミスマッチ結合蛋白質がミスマッチを認識して結合する少なくとも約30ヌクレオチドの安定なヘテロ2本鎖を形成するならば、3'又は5'末端にて非ハイブリッド形成配列によりフランギングされていることができる。

RNA又はDNAハイブリッド形成パートナーは多様な周知の方法で調製することができる。従来の方法を用いた化学的オリゴヌクレオチド合成によりオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを調製するのが最も好みしい。オリゴヌクレオチドの合成法は、例えばWu, R. *et al.*, Prog. Nucl. Acid. Res. Molec.

走可能な形態であるか、より好みしくは固体担体又はキャリヤー上に固定されている(図3を参照)。ハイブリッド形成パートナーの固定可能な形態は、一般にハイブリッド形成反応の後に簡単に固定することができる形態である。最後にハイブリッド形成パートナーが固定される方法は本発明に重要ではなく、ハイブリッド形成パートナーと標的核酸配列の間で形成されたハイブリッドがハイブリッド形成パートナーの性質により固定されれば、利用するいずれの方法を取ることもできる。

固定された形態でハイブリッド形成反応に導入される場合、ハイブリッド形成パートナーは、ハイブリッド形成パートナー及びそれと結合する反応結合物のいずれの成分も、後で残りの結合物から単離又は分離することができるようないずれの適した形態であることもできる。分離は遠心、離心、クロマトグラフィー、デカンテーションなどにより行うことができる。

当該技術分野における通常の熟練者は、本発明に従って有用な固定ハイブリッド形成パートナーの多様な組成及び形態が分かるであろう。例えばハイブリッド形成パートナーは凝集又は他の場合沈殿させる、不溶性材料、ポリマー又は担体に結合する、あるいはアガロース又はポリアクリルアミドなどのゲル中に閉じ込めることができる。(Methyl, E. enzymol. 12B: 635 (1968); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67: 807 (1970))。最も好みしいのは、ハイブリッド形成パートナーが共有結合又は非共有結合により結合又は固定された固体担体である。適度に安定で強い結合を有する方法を用いた吸着による非共有結合が好みしい。これは又、ハイブリッド形成パートナーへのアミノ基側基を用いても行うことができ、アミノ基

## 特表平7-500493 (8)

その後膜上に吸着させることができる。真空中の80°C近辺にて約2-3時間ペーリングすることによりハイブリッド形成パートナーを固定することができる (Thomas, P. S., Meth. Enzymol., 100: 265)。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーの共有結合固定も行うことができる。共有結合固定で有用な多数の担体材料及びカップリング法が知られている。例にはカーボジイミド又はカルボニルジイミダゾールにより活性化されたリン酸基を介したホスホセルロースへのカップリング (Bautz, E. K. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60: 400-408 (1963); Shih, T. Y. et al., Biochemistry, 113: 3411-3418 (1974))、又はm-ジアゾベンゾイルオキシメチルセルロース上のジアゾ基のハイブリッド形成パートナーのG及びT残基との反応 (Noyes, B. E. et al., Cell, 5: 301-310 (1975); Reisner, J. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 85: 1104-1112 (1978)) が含まれる。多糖担体は、水溶性カーボジイミド活性化によりオリゴヌクレオチドの末端リン酸基と担体のヒドロキシル部分の間で形成されるホスホジエステル結合を介して (Richwood, D., Biochim. Biophys. Acta, 269: 47-50 (1972))、又はオリゴヌクレオチド上の攻撃部位とシアノゲンプロミド活性化担体のカップリングにより (Arndt-Jovin, D. J. et al., Eur. J. Biochem., 54: 411-418 (1975)) カップリングすることができる。さらにハイブリッ

物質を用いてハイブリッド形成パートナーを固体担体（例えば膜又はフィルター）に“ひっかける (hook)”又は結合する。所望のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドを選ばれた固体担体に結合する方法は該技術分野における通常の熟練者に周知である。

“環状担体”はオリゴー又はオリゴヌクレオチドを結合することができますの担体も意味する。周知の担体又はキャリーには天然又は合成セルロース、例えばニトロセルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド及びアガロースが含まれる。実際に固体材料は、固定されたハイブリッド形成パートナーが環状核酸分子とハイブリッド形成することができ、ミスマッチー結合蛋白質がその後ハイブリッド形成パートナー一部のポリヌクレオチドハイブリッドに結合することができれば、いずれの可能な構造的形状であることもできる。かくして担体形状は微粒子、ビーズ、多孔質及び不透通性ストリップ及び膜、試験管及びミクロタイパーレートなどの反応容器の内表面などを含むことができる。好ましい担体にはニトロセルロース円板又はストリップが含まれる。当該技術分野における熟練者はオリゴー又はオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを結合するための多くの他の適した担体を知っているか、又は日常的実験によりそれを知ることができるであろう。

ニトロセルロース膜上にハイブリッド形成パートナーを吸着する好ましい方法は、ハイブリッド形成パートナーの精液にヨウ化ナトリウムを飽和させ、アリコートを膜上にスポット又は連続することを含む (Bresser et al., DNA, 2: 243 (1983))。別の場合ハイブリッド形成パートナーをグリオキサル (1M以下) で処理し、

D形成パートナーの3'ヒドロキシ末端を過ヨウ素酸塩で酸化し、アミン又はヒドログリコール酸を有する担体とのシフ塩基形成によりカップリングすることができる (Gillham, P. T., Method. Enzymol., 21: 191-197 (1971); Hansske, H. D. et al., Method. Enzymol., 59: 172-181 (1979))。攻撃部位を有する担体はシアヌアル酸塩化物と反応させ、その後ポリヌクレオチドと反応させることができる (Hunger, H. D. et al., Biochim. Biophys. Acta, 653: 344-349 (1981))。

一般に、標的配列に相補的な配列を試料核酸にハイブリッド形成するために利用できれば、いずれの方法もハイブリッド形成パートナーの固定に用いることができる。特定の方法又は材料は本発明に重要ではない。直接固定ハイブリッド形成パートナーを用いる代わりに固定可能形態を用いることができ、速度論がより速い液体中でハイブリッド形成段階を行うことができる。そのような過程の場合典型的に、固定形態の反応パートナーに露出すると反応パートナーと安定な共有結合又は非共有結合を形成して固定形態となることができる反応性部位を含むハイブリッド形成パートナーが用いられる。ハイブリッド形成パートナー中のそのような反応性部位は、固定反応パートナーとして働くアビシン又は抗体などの結合物質と特異的非共有結合が可能なビオチン又はハプテン部分などの結合部位である。

基本的にいずれの物質の対も安定な結合、すなわちその後の検定段階、主に分離及び後出脱離の間、実質的にそのままで残る結合又はカップリングを形成する相互作用のための適した親和性を示す反応性部位/反応

性パートナー対を含むことができる。ハイブリッド形成パートナー上の反応性部位は“結合部位”と呼ばれ、反応パートナーはそれが共有又は非共有結合を形成する“結合物質”と呼ばれる。

類似の1つにおいて、結合部位はハイブリッド形成パートナーの非ハイブリッド形成部分に存在し、ハイブリッド形成パートナーの化学的構造の結果であることが好ましい。ヌクレオチド配列内に存在する結合部位の例は、プロモーター蛋白質により結合することができるプロモーター配列、リプレッサー蛋白質により結合することができるオペレーター配列、又は特異的抗体により結合することができる産物ヌクレオチド、例えば5-プロモデオキシウリジン又は5-ヨードデオキシウリジン (米国特許出願第2,125,964号明細書)、チミングリコール (Rajagopalan et al., Radiat. Res., 87: 498-510 (1984); Hubbard, K. et al., Radiat. Res., 118: 257-268 (1989)) である。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーの化学的修飾により導入される結合部位は特に有用であり、通常特異的結合対の1つのメンバーをハイブリッド形成パートナーに結合させることを含む。その中から選ばるべき有用な結合対にはビオチン/アビシン (卵白アビシン及びストレバタビシンを含む)、ハプテン (又は抗原)/抗体、炭水化合物/レクチン、酵素/阻害剤などが含まれる。結合対が蛋白質メンバー及び非蛋白質メンバーを含む場合、蛋白質メンバーはハイブリッド形成の変性条件下で不安定なので非蛋白質メンバーをハイブリッド形成パートナーに結合するのが通常好ましい。好ましい系は、ハイブリッド形成パートナーをビオチン又はハプテンに結合し、それぞれ固定アビシン又は

特表平7-500493 (9)

抗-ハプチン抗体試薬を用いることを含む。

認定可能な形態でハイブリッド形成パートナーがハイブリッド形成反応に導入される場合、それに後く形成された2本鎖の認定及びミスマッチー結合蛋白質ならびに検出ための試薬の添加の段階は、いずれの所産の順序で行うこともできる。認定及びミスマッチー結合蛋白質ならびに他の試薬の添加は、必要な試薬及び材料の同時に添加、あるいは洗浄又は分離段階の介在する、又は介在しないいずれかの順序の順次添加により行うことができる。順次添加に従う場合もちろん、形成されたハイブリッドを過剰とし、ミスマッチー結合蛋白質及び検出試薬との相互作用を阻害しないように、加えられる試薬の濃度を考慮する。

好ましいミスマッチー結合蛋白質は、1本鎖ポリヌクレオチド又は完全に対合しているハイブリッドを有して併除し、ハイブリッド形成パートナーと相補的な標的試料核酸の間で形成されたDNA-DNA(又はDNA-RNAあるいはRNA-RNA)塩基対ミスマッチハイブリッドと結合する能力を有することを特徴とする。好ましい様様の場合、E. コリからの本来のMut S蛋白質そのままを用いる。しかし本明細書で用いられる“ミスマッチー結合蛋白質”という用語は、本来の蛋白質そのままの標的的誘導体も含むものとする。“機能的誘導体”は、本発明に従い、ミスマッチ核酸ヘテロ2本鎖に結合する能力を保持している蛋白質の“フラグメント”、“変異体”、“類似体”又は“化学的誘導体”を意味する。

ミスマッチー結合蛋白質の“フラグメント”は、分子のサブセット、すなわちより短いペプチドを意味する。蛋白質の“変異体”は蛋白質全体又はそのDNA-ハイブリッド結合フラグメントに實質的に類似の分子

を意味する。ミスマッチー結合蛋白質、例えばMut Sの変異体は、当該技術分野において周知の組み替えDNA法により調製することができる。

Mut Sの好ましい標的的誘導体は、E. コリMut Sの他のバクテリア種における同族体、例えばサルモネラ・ティフィムリウムのMut S蛋白質(Lu, A. L. et al., 同上; Habet, L. T. et al., 同上; Pang, P. P. et al., 同上)又はストレプトコックス・ニューモニアエのhexA蛋白質(Priebe, S. D. et al., 同上; Haber et al., 同上)である。さらにMut S又はHex Aの可能な異種同族体、例えばヒト、マウス又はハムスターDNAにおいて調定された相因配列によりコードされるものも用いることができる(Shimada, T. et al., J. Biol. Chem. 264: 20171 (1989); Linton, J. et al., Molec. Cell. Biol. 7: 3058-3072 (1989); Fuji, J. et al., J. Biochem. 264: 10057 (1989))。

ミスマッチー結合蛋白質の“化学的誘導体”には、融合蛋白質の場合のような追加された範囲のアミノ酸を含む、通常は蛋白質の一部でない付加された化学的部分が含まれる。ペプチドの共有結合による修飾は本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾は、蛋白質の側鎖とされたアミノ酸基を、選ばれた側鎖又は末端残基と反応することができる有機調製剤と反応させることにより分子中に導入することができる。そのような誘導の例はハプチン修飾であり、その場合トリニトロフェニルなどのハプチン性基が蛋白質と共に投し、検出可能な標識をした検出目的の結合パートナーの標的として働く。別の場合蛋白質をビオチン基の共役

により修飾することができ、検出可能な標識をしたアビシン又はストレタビシンを検出目的の結合パートナーとして用いることができる。

ミスマッチー結合蛋白質の好ましい化学的誘導体は、ミスマッチー結合蛋白質と他の蛋白質(“融合蛋白質パートナー”)の間の融合蛋白質であり、その場合他の蛋白質が構造的又は機能的特徴を与えて融合蛋白質を検出に有用なものとする。例えば融合蛋白質パートナーは、検出目的で抗体が結合することができる抗原性部位に寄与することができる。ミスマッチー結合蛋白質又は機能的誘導体及び酵素の間の融合蛋白質は、例えば当該技術分野において周知の通り融合蛋白質の酵素部分が色素原基質からの着色反応生成物の形成を触媒する能力があるために、検出のためのより直接的な手段を有する。

好ましい融合蛋白質は、Mut S又は機能的誘導体と酵素B-ガラクトシダーゼの間の融合蛋白質である。この様様の場合、固体担体へのB結合の存在をこの酵素の色素原基質を用いて検出することができる。そのような基質の例はNABG(ナフトール AS-B1-B-d-ガラクトビラノシド)である。

ミスマッチー結合蛋白質の融合蛋白質誘導体は、当該技術分野において周知の方法を用いて調製することができる(例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照)。

本検定の方法に有用な蛋白質の選択は、当該技術分野における通常の熟練者が従来の方法を用いて行うことができる。従って例えば本発明に

おいて有用なミスマッチー結合蛋白質の存在に関して供給源を評価する場合、Jiricny et al. (その参照文献の記載事項は引用することにより全体が本明細書の内容となる)により記載されているようなミスマッチー結合検定を行うことができる。フィルター結合検定(filter binding assay)を用いるのが好ましい。オリゴヌクレオチドヘテロ2本鎖の両側のために、好ましくは16塩基のオリゴヌクレオチドをキナーゼ反応を用いて<sup>32</sup>Pで、及びT4-ポリヌクレオチドキナーゼなどのキナーゼを用いてガンマ-<sup>32</sup>P-ATPで標識する。その後5'-標識オリゴヌクレオチド(これは-20°Cで保存できる)を、1個の標基対ミスマッチを有する相補的オリゴヌクレオチドと標準的条件下でアニーリングする。アニーリングされた16塩基対ヘテロ2本鎖を過剰の試薬のべき蛋白質と混合し、水上に30分間保つ。その後混合物を検定液(高濃度で予備複数させたニトロセルロースフィルターに適用する。種やかに飲料水吸引し、フィルターを氷-冷検定液(液)で強力に洗浄する。その後フィルターを空気乾燥し、シンチレーション液に懸濁し、カウントする。フィルターに付着した蛋白質のために、フィルター上のカウントはすべて指定ミスマッチー結合蛋白質の結合に帰することができる。そのような蛋白質がない場合、標識されたオリゴヌクレオチドヘテロ2本鎖はフィルターを通過する。従ってそのような簡単な検定を用いることにより、本発明の方法で有用なミスマッチー結合蛋白質を容易に検出し、選択することができる。

当該技術分野において既知の通り、種々のハイブリッド形成条件を本発明の方法で用いることができる。典型的にハイブリッド形成はわずかな高温、例えば約35°C-75°C、通常約65°Cにて、約6-8のpH

## 特表平7-500493 (10)

かなり低い温度でインキュベートすると、関連性の低い塩基配列をハイブリッドさせる。

6. 検出精度及びインキュベーション時間：通常反応をハイブリッド形成に運動するため、ハイブリッド可逆試料核酸又はハイブリッド形成パートナー核酸の1つが過剰に、通常100倍過剰かそれ以上で存在する。

7. 実性試薬：ホルムアミド及びウレアなどの水素結合切断試薬の存在は、ハイブリッド形成の柔軟度を増す。

8. インキュベーション時間：インキュベーション時間が長い程ハイブリッド形成はより完全になる。

9. 体積排除試薬(volume exclusion agent)：デキストラン及びデキストランサルフェートを例とするこれらの試薬が存在すると、ハイブリッド形成成分の有効濃度が向上し、それにより得られるハイブリッド形成の速度が増すと思われる。

通常、ハイブリッド形成の場合に選ばれる温度条件は、形成されたハイブリッドへのミスマッチー結合蛋白質の結合、又はミスマッチー結合蛋白質への抗体又は他の結合パートナーの結合に適合しない。従ってミスマッチー結合蛋白質及び結合パートナー試薬の結合段階及び検出段階は、ハイブリッド形成段階の完了後に行なう。通常反応混合物を約3°C-約40°Cの範囲の濃度とし、その後ミスマッチー結合蛋白質及び過剰の試薬の結合ならびに検出段階を行なう。

RNAハイブリッド形成パートナーを用いた特異的検定の場合、RNAがホスホジエステル結合のアルカリ加水分解により、又はリボヌクレアーゼ(Rnases)の存在により部分的に分解されることが予想さ

で達したイオン濃度(例えば2X SSC、ここで1X SSC=0.15Mの塩化ナトリウム及び0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH 7.0)の緩衝液、ウシ血清アルブミンなどの蛋白質、E. coli (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)により標示されているスクロース及びエピクロロヒドリンのコポリマーを隔離する面膜)ポリビニルビロリドン、及びコウシ樹脂又はサケ精子からなどの変性異種DNAを含む溶液中で行われる。ハイブリッド形成が起こるために必要な試料及びハイブリッド形成パートナー間の特異性の程度は、条件の柔軟度に依存する。ハイブリッド形成の程度及び特異性は、以下の主条件により影響される。

### 1. 核酸試料の純度。

2. G-C塩基対の含有率：G-C塩基対はA-T又はA-U塩基対よりも高い熱安定性を示す。従ってG-C含有率の高いハイブリッドは高温で安定である。

3. 相同塩基配列の長さ：例えば6塩基より短いなどの短い塩基配列は多くの核酸において繰り返しの可能性が高い。そのような短い配列を含むハイブリッド形成においては特異性が低いか、又は得られない。本発明のハイブリッド形成パートナー配列は、オリゴヌクレオチドの場合少なくとも約30塩基で最高約100塩基、cDNA分子の場合それより多く含まれることが好ましい。

4. イオン濃度：再アニーリングの速度は、インキュベーション温度のイオン濃度の増加と共に増す。ハイブリッドの熱安定性も向上する。

5. インキュベーション濃度：最高再アニーリングは、与えられた2本鎖の融点(Tm)より低い約25-30°Cの温度で起こる。最高より

れる。前者の場合、ハイブリッド形成パートナーを約10より高いpHに曝露することにより加水分解を抑制することができる。RNasesは、ドデシル硫酸ナトリウム、アクリルトリカルボン酸、リボヌクレオチドバナジル錯体、ヘパリンジエチルビロカーボネート及び哺乳類供給原から単離された蛋白質性RNase阻害剤などの物質の存在により有効に阻害することができる。

ハイブリッド形成パートナー親的ポリヌクレオチド(DNA-DNA、DNA-RNA又はRNA-RNA)ハイブリッドに結合したミスマッチー結合蛋白質は、直接又は間接に検出することができる(図2を参照)。直接検出は、ミスマッチー結合蛋白質を検出可能な標識、例えば放射性標識、蛍光標識、共役群素などで標識することを意味し、それは下記にさらに詳細に記載する。別の場合、上記の通り組み替えDNA法により、ミスマッチー結合蛋白質を検出の容易な融合パートナーとの融合蛋白質として生成することができる。融合蛋白質ならびに検出可能な標識をされた、又は共役したミスマッチー結合蛋白質が本来の、改変されていないミスマッチー結合蛋白質の反応性及び結合特異性を保持していることが重要である。この反応性及び特異性は、当該技術分野における通常の熟練者が、日常的試験、例えば本明細書に記載の検定により確かめることができる。

間接的検出は、ミスマッチー結合蛋白質又はミスマッチー結合蛋白質に共役した反応性部分、あるいはミスマッチー結合蛋白質の融合蛋白質パートナーに特異的な結合パートナーを用いる方法を意味する。ミスマッチー結合蛋白質がMu LSの場合、好ましい結合パートナーは抗-Mu LS抗体(又はその抗原-結合フラグメント)である。

本発明の方法で有用な抗体試薬のいずれも抗体全體、抗体フラグメント、多機能抗体凝聚体(polyfunctional antibody aggregates)、あるいは一般に抗体からの1個又はそれ以上の特異的結合部位を含む物質を含むことができる。抗体は免疫グロブリンイソ型、例えばIgG、IgMなどのいずれかであることができる。そのような抗体の抗原-結合フラグメントのいずれか、例えばFab'又はF(ab')<sub>n</sub>フラグメントを用いることもできる。さらに免疫グロブリン又はそのフラグメントの凝聚物、ポリマー、高分子及び共役体を場合により用いることができる。

抗体試薬のための免疫グロブリン供給源は、従来のポリクローナル抗体群の調製、又はモノクローナルあるいはキメラ抗体の調製などのいずれの方法によっても得ることができる。抗体群は、マウス、ウサギ、モルモット又はヒツジなどの動物をMu LS蛋白質などの適した免疫原で免疫化することを含む十分に確立された方法により得ることができる。

別の場合結合パートナーは、ミスマッチー結合蛋白質と融合した融合蛋白質パートナー、例えばβ-ガラクトシダーゼに特異的な抗体であることができる。さらにミスマッチー結合蛋白質分子に共役したハプテン基に特異的な抗体を用いることができる。他の結合パートナーは、ミスマッチー結合蛋白質がビオチンの付加により修飾された場合のアビシン又はストレブタビシンであることができる。さらに別の想像の場合、結合パートナーは免疫グロブリン分子に結合する性質を有する非免疫グロブリン蛋白質、例えば当該技術分野において周知のスタフィロコッカスのプロテインA又はストレプトコッカスのプロテインGであることができる。結合パートナーはそれ自身が検出可能な標識をされているか、又

特表平7-500493 (11)

機能的弱抗体はATPの存在下で突然変異検出検定に加えられる。その後結合Mu<sub>1</sub>Lを検出する。別の場合、上記の通り赤細胞Mu<sub>1</sub>Lを第1結合パートナーとして用い、その後Mu<sub>1</sub>Lに結合する標識第2結合パートナーを用いるか、あるいは赤細胞第2結合パートナーを用いてから検出可能な標識をした第3結合パートナーを用いることができる。Mu<sub>1</sub>L結合パートナーに関して上記で記載した通り、Mu<sub>1</sub>Lのための第2結合パートナーはMu<sub>1</sub>Lに特異的な抗体、Mu<sub>1</sub>Lに共役したハプテンに特異的な抗体、ビオチンがMu<sub>1</sub>Lに共役している場合アビシン又はストレプタビシン、Mu<sub>1</sub>Lの結合パートナー蛋白質に関する抗体などであることができる。

上記の第1又は第2種番パートナーが抗体である場合、検出はエンザイムイムノアッセイ (EIA) (Voller, A., Diagnostic Horizons 2:1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD: Voller, A. et al., J. Clin. Pathol. 31: 507-520 (1978); 米国再発行特許第31, 006号明細書; 英国特許第2, 019, 408号明細書; Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73: 482-523 (1981); Maggio, B. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980) 又はラジオイムノアッセイ (RIA) (Wientraub, B., Principles of Radiolimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay

は検出可能な標識をされた第2結合パートナー、例えば第1抗体に特異的な第2抗体により間接的に検出することもできる。かくしてウサギ抗体ミスマッチー結合蛋白質抗体が第1結合パートナーとして作用する場合、標識されたヒツジ抗体ウサギ免疫グロブリン抗体は第2結合パートナーである。他の選択の場合、ミスマッチー結合蛋白質の結合蛋白質パートナーの存在により生成される信号を、その結合蛋白質に特異的で検出可能な標識をされた抗体（例えば抗ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体）を用いた反応により増幅する。当該技術分野における通常の熱練者は、不必要な実験を行うことなく当該技術分野で周知の従来の方法を用い、そのような第1及び第2結合パートナー系として可能な多くのを考案することができる。

さらに別の様な場合、結合パートナーは E. コリ、S. チフィムリウム又は他の供給菌から得た Mut L 蛋白質 (Grillley, M. et al., J. Biol. Chem. 264: 1000-1004 (1989); Modrich, P., 1989, 同上; Lahue et al., 1989, 同上) あるいはその機能的誘導体であることができる。好ましい機能的誘導体は Mut L と検出の容易な第 2 総合パートナー蛋白質、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質である。分子量が 90 kDa の精製 Mut L 蛋白質は ATP の存在下で Mut S 及び核酸ヘテロ 2 本鎖の複合体に選択的に結合することが知られている。Mut S はミスマッチー含むヘテロ 2 本鎖又は遊離の Mut S に直接は結合しない。Mut L 蛋白質はバクテリア中でクローニングされ、発現された (Pang et al., 同上)。かくして本発明に従って用いる場合、好ましくは検出可能な標識をされた形態の Mut L 蛋白質又は

y Techniques. The Endocrine Society, March 1986, pp. 1-5, 46-49及び68-78)を含む従来の多様なイムノアッセイのいずれを用いても行うことができる。

好みい様の場合、M u t S -特異的抗体又は抗体フラグメントに、それを酵素に結合することにより検出可能な標識をし、E I A 又は酵素一結合イムノソルベントアッセイ ( E L I S A ) で用いる。今度は後でこの酵素を、例えば分光光度測定、蛍光測定又は最も好みしくは複数による手段で検出できる化学的部分を与えるような方法で基質に標識する。基質は標識で見ることができる反応生成物を生成する色素原基質であることが好ましい。

MuT S-特異的抗体などのミスマッチャー結合蛋白質のための結合ペートナーに検出可能な標識をするために用いることができる酵素には、アルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュペーオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、スクフィロコッカヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファーグリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、アスパラギナーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるがこれらに限られるわけではない。

結合パートナー、例えば MuTS-特異的抗体を放射性標識することにより、ラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて固体細胞に結合した MuTS を検出することができる。放射性同位体は、ガンマカウンター

又はシンチレーションカウンターを用いるなどの方法で、あるいはオートラジオグラフィーにより検出することができる。本発明の目的に特に有用な同位体は： $^3\text{H}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、及び軽ましくは $^{113}\text{In}$ である。

第1又は第2結合パートナーを蛍光化合物で標識することもできる。蛍光標識した抗体を適した波長の光に曝露すると、その存在を蛍光により検出することができる。最も普通に用いられる蛍光標識化合物には、フルオレセンインソチオシアナート、ローグミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、O-フタルアルデヒド及びフルオレサミンがある。

第1又は第2結合パートナーは、それを化学発光化合物にカップリングさせることにより検出可能な標識をすることもできる。その後化学発光-付加抗体の存在を、化学反応の経路で生ずる化学発光の存在を検出することにより決定する。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、チロマチック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びオキザレトエステルである。

同様に、生物発光化合物も第1又は第2結合パートナーの標識に用いることができる。生物発光は、生物系で見られる種類の化学発光であり、その場合触媒蛋白質が化学発光反応の効率を増加させる。生物発光蛋白質の存在は発光の存在の検出により決定される。標識の目的に重要な生物発光化合物はルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。

検定するべき試験試料はいずれの問題の標本中にあることともでき、一般に医学的、歯医学的、環境的、栄養的、又は工芸的に重要な材料であ

る。特にヒト及び動物拭拭及び体液を、それらが核酸を調製できる細胞を含んでいれば、本方法で検定することができる。好みしい供試細胞には膣液、精子、袖の組織、母乳、尿、脛脛骨膜、唾液、便、肺吸引物（lung aspirates）、咽頭スワブ、口腔スワブ及び歯出物、成績スワブ及び鼻咽頭吸引物が含まれる。

試料が主に細胞中に天然に存在するDNAなどの2本鎖核酸を含む場合、最初に試料を処理して細胞から核酸を放出させるが、それは機械的破壊（例えば凍結／乾燥、摩擦、碎砕処理）、物理的／化学的破壊、又は先剤処理（例えばTrition、Tween、又はドデシル硫酸ナトリウム）、浸透圧ショック、熱又はアルカリライス（リソチーム、プロテイナーゼK、ペプシンなど）により行うことができる。

本説明の方法に従い、放出 ds DNA を制限エンドヌクレアーゼ酵素により切断し、所望の配列を含む検定に適した長さのフラグメントを形成することができる。制限酵素の選択は所望の標的配列、及びその配列の両側に存在する適した制限酵素認識部位に依存する。当該技術分野における通常の熟練者は不必要な実験を行わずに部位を同定し、酵素を選択することができるであろう。例えば Sambrook, J. et al., 四巻を参照せよ。

制限酵素焼成の後、煮沸水中の加熱又はアルカリ処理（例えば0.1N水酸化ナトリウム）により植物の変性を行うのが好ましい。得られる試験媒体は1本筋の形態で核酸を含み、その後それを本発明の方法に従って検定することができる。

本発明の方法はヒトにおける特定の突然変異の検出の方法及びキットも提示する。下記の表1は、本発明の方法を用いて検出できるヒトの突

特表平7-500493 (12)

熱度圖の一覧表を示すが、これらに限られるわけではない。その記載事項が引用することにより本明細書の内容となるCooper, D. N. et al., Hum. Genet. 85: 55-74 (1990) 6  
参照せよ。

特表平7-500493 (13)

本発明は、上記の方法の実行に有用なキット又は試験系も目的としている。そのようなキットは本明細書に開示されている方法に従う検定を行うのに必要な必須の成分から成る試験の組み合わせを含む。試験系は商業的に包装された形態で、試験の相溶性が許せば組成物又は混合物として、試験装置の形状で、あるいはより典型的に試験キットとして、すばやく試験を入れた1個又はそれより多い容器、装置などを組み合わせ、通常検定を行うために書かれた指示を含んで包装して与えられる。本発明のキットは本明細書に記載の種々の検定型式を行うためのいずれの形式及び組成物を含むこともできる。

すべての場合に試験系は(1)本明細書に記載の固定可能な、又は固定されたハイブリッド形成パートナー、及び(2)ミスマッチー結合蛋白質又は機能的誘導体を含む。ミスマッチー結合蛋白質は場合により検可能な標識をされていることができる。キットは場合によりミスマッチー結合蛋白質のための第1結合パートナー、例えば抗-Mut S抗体、anti L1蛋白質又は機能的誘導体、及び追加の結合パートナー又は検出能的な標識をした蛋白質を含むことができる。本発明のキットはさらに補的化学品、例えばハイブリッド形成液波の成分、試験試料中の2本鎖DNAを1本鎖形態に変換することができる変性剤、又は試料複数のフラグメントを形成するための制限酵素を含むことができる。

ここで本発明を一般的に記載してきたが、以下の実施例を参照することにより本発明をさらに容易に理解することができるであろう。実施例は例として示すものであり、本発明を制限するものではない。

六題例 1

## 突然変異DNA配列に関する血液からの試料の精選

## 特表平7-500493 (14)

オリゴヌクレオチドフラグメントへの過した制限フラグメントの結合を起こす。

フィルターを洗浄し、Mut Sをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナル ウサギ抗-Mut S抗体をフィルターに加えて結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュペーキシダーゼー共役ヒツジ抗-ウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュペーキシダーゼに関する色素原基質を加え、暗色線（又はプラスの印）が現れるまで発色反応を展開させ、線が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう：

A. DNA中に点突然変異がない試料の場合（陰性）：

(1) 点（負の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こる。

(3) かくして着色“マイナス”的印がフィルター上に現れ、試料中の突然変異DNAに関する試験において陰性の結果を示す。

B. DNA中に点突然変異を有する試料の場合（陽性）：

(1) 点（負の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有

検定型式は図3に一般的に記載されている。試料DNAは、1個の塩基対により、又は1個あるいは数個の塩基対の付加又は欠失により野生型と異なる特定の突然変異の存在に関して調べる血液細胞から得る。その後DNAを変性し、その時点で検定の準備ができる。

約30ヌクレオチドの試験DNAハイブリッド形成パートナーを、問題の突然変異の付近の野生型遺伝子配列に対応する配列を有するように構造する。ミスマッチに関する正の標準として、線状赤血球ヘモグロビンの点突然変異を用いる。突然変異配列を有するオリゴヌクレオチド（エクソン10）を製造する。検定のための負の標準として、野生型配列のものであることが既知のオリゴヌクレオチド、エクソン10の野生型ヒトヘモグロビン配列を製造する。

ハイブリッド形成パートナー-DNAをニトロセルロースフィルター上に以下の要領で固定する：

(a) “プラス”的印の垂直線の形態の試験ハイブリッド形成パートナ-DNA。

(b) 正の標準のDNAを同一の“プラス”的印の水平線の形態でフィルター上に固定する。

(c) 負の標準のDNAを“プラス”的印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してオリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ（Sambrook et al., 同上）。

試料DNAを10~100μg/mlの濃度で加え、0.1~0.3M NaCl中の45~55°Cでハイブリッド形成反応を行い、3個の

し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起り、水平線が見える。この試料からのDNAは他のDNA配列中に点突然変異を有するので、“プラス的印”的印が着色反応生成物を与える。

### 実施例1

#### Mut S結合パートナーを用いた突然変異DNA配列に関する検定

一般的検定型式は、実施例1の記載と同様である。試料DNAは1個の塩基対により、又は1個あるいは数個の塩基対の付加又は欠失により野生型と異なる特定の突然変異の存在に関して調べる血液細胞から得る。その後DNAを変性し、その時点で検定の準備ができる。

約30ヌクレオチドの試験DNAハイブリッド形成パートナーを、問題の突然変異の付近の野生型遺伝子配列に対応する配列を有するように構造する。ミスマッチに関する正の標準として、線状赤血球ヘモグロビンの点突然変異を用いる。突然変異配列を有するオリゴヌクレオチド（エクソン10）を製造する。検定のための負の標準として、野生型配列のものであることが既知のオリゴヌクレオチド、エクソン10の野生型ヒトヘモグロビン配列を製造する。

ハイブリッド形成パートナー-DNAをニトロセルロースフィルター上に以下の要領で固定する：

(a) “プラス”的印の垂直線の形態の試験ハイブリッド形成パートナ-DNA。

(b) 正の標準のDNAを同一の“プラス”的印の水平線の形態でフィルター上に固定する。

(c) 負の標準のDNAを“プラス”的印の近辺の点の形態でフィルタ

ーに適用する。

フィルターを処理してオリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ（Sambrook et al., 同上）。

試料DNAを10~100μg/mlの濃度で加え、0.1~0.3M NaCl中の45~55°Cでハイブリッド形成反応を行い、3個のオリゴヌクレオチドフラグメントへの過した制限フラグメントの結合を起こす。

フィルターを洗浄し、Mut Sをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

Mut L-B-ガラクトシダーゼ結合蛋白質を第1結合パートナーとして加え、結合させ、非結合材料を洗い流す。

第2結合パートナー、ポリクローナルウサギ抗-B-ガラクトシダーゼ抗血清をフィルターに加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後第3結合パートナー、ホースラディッシュペーキシダーゼ共役ヒツジ抗-ウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュペーキシダーゼに関する色素原基質を加え、暗色線（又はプラス的印）が現れるまで発色反応を展開させ、線が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう：

A. DNA中に点突然変異がない試料の場合（陰性）：

(1) 点（負の標準のハイブリッド形成パートナー）は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こる。

(3) かくして着色“マイナス”的印がフィルター上に現れ、試料中の突然変異DNAに関する試験において陰性の結果を示す。

B. DNA中に点突然変異を有する試料の場合(陽性):

(1) 点(負の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。この試料からのDNAは標的DNA配列中に点突然変異を有するので、“プラスの印”的墨痕が着色反応生成物を与える。

実施例III

組織試料中の突然変異p53発癌遺伝子の検出

p53遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であると思われ(Levine, A. et al., *Nature* 351: 453-455 (1991))、その中の多くの部位における突然変異が腫瘍、特に大腸肛門癌(rectal carcinoma)の発現を生ずる。例えばKinzler, K. W. et al., *Science* 251: 1366-1370 (1991); Kern, S. E. et al., *Oncogene* 6: 131-136 (1991); Vogelstein, B., *Nature* 348: 681-682 (1990); Baker, S. J. et al., *Science* 249: 912-915 (1990)も参照せよ。

腫瘍組織からヒトDNAを単離する。単離されたDNAを標準的条件

特表平7-500493 (16)

下で剪断する。その後DNAを変性し、その時点で検定の準備ができる。

標準的方法でp53遺伝子に対するcDNA分子を製造し(Sambrook et al., 同上)、ハイブリッド形成パートナーとする。既知の突然変異が内在する領域はp53配列全体に分散されている。

ハイブリッド形成パートナー-DNAを以下のようにしてニトロセルロースフィルター上に固定する(図3を参照):

(a) “プラス”的印の墨痕の形態の試験ハイブリッド形成パートナー(p53 cDNA)をスポットする。

(b) 正の標準のDNAを同一の“プラス”的印の墨痕の形態でフィルター上に固定する。

(c) 負の標準のDNAを“プラス”的印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してハイブリッド形成パートナー ポリーやオリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ。

試料DNAを反応物に加え、ハイブリッド形成温度が55~60°Cであること以外は(上記の通り)ハイブリッド形成条件下でインキュベートし、3個のハイブリッド形成パートナー ポリーやオリゴヌクレオチドフラグメントへの結合したDNAフラグメントの結合を起こす。

フィルターを洗浄し、MuTSをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナルウサギ抗-MuTS抗体をフィルターに加えて結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュパーオキシダーゼ共役ヒツジ抗-ウサギ

免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュパーオキシダーゼに関する色素原基質を加え、着色“マイナス”又は“プラス”的印が現れるまで発色反応を展開させ、印が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう:

A. 突然変異p53発癌遺伝子がない試料の場合:

(1) 点(負の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正の標準のDNAに相補的な非突然変異配列を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こる。

(3) かくして着色“マイナス”的印がフィルター上に現れ、試料DNAの突然変異p53発癌遺伝子に関する試験において陰性の結果を示す。

B. 突然変異p53発癌遺伝子を有する試料の場合:

(1) 点(負の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こり、水平線が見える。この試料からのDNAは標的DNA配列中に少なくとも1箇所の点突然変異を有するので、“プラスの印”的墨痕が着色反応生成物を与える。

実施例IV

突然変異p53発癌遺伝子の発現の検出

ヒトmRNAを従来の方法により腫瘍組織から単離する(Sambrook et al., 同上)。

ook et al., 同上を参照)。標準的方法でp53遺伝子に対するcDNA分子を製造し(Sambrook et al., 同上)、ハイブリッド形成パートナーとする。検定型式は、図3に一般的に記載されている。

ハイブリッド形成パートナー-DNAを以下のようにしてニトロセルロースフィルター上に固定する:

(a) “プラス”的印の墨痕の形態の試験ハイブリッド形成パートナー(p53 cDNA)をスポットする。

(b) 正の標準のDNAは、腫瘍組織中で発現されることが知られており、改変された塩基を1個有する遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドを含む。このDNAを同一の“プラス”的印の墨痕の形態でフィルター上に固定する。

(c) 正の標準として用いたオリゴヌクレオチドの野生型配列を含む負の標準のDNAを“プラス”的印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してハイブリッド形成パートナー ポリーやオリゴヌクレオチドを固定し、すべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ。

試料mRNAを加え、反応物をハイブリッド形成条件下でインキュベートし、3個のハイブリッド形成パートナー ポリーやオリゴヌクレオチドへのmRNAの結合を起こす。

フィルターを洗浄し、MuTSをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナルウサギ抗-MuTS抗体をフィルターに加えて結合

させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュパーオキシダーゼー共役ヒツジ抗ウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

ホースラディッシュパーオキシダーゼーに関する色素原基質を加え、紫色“マイナス”又は“プラス”的印が現れるまで発色反応を繰り返せ、印が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう：

A. 野生型 p 53 遺伝子を発現する試料の場合：

(1) 点(負の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) 水平線のみが見える。從って着色“マイナス”的印がフィルター上に現れ、試料 mRNA 中の突然変異 p 53 発現遺伝子の発現に関する試験における陰性の結果を示す。

B. 突然変異 p 53 遺伝子を発現する試料の場合：

(1) 点(負の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が誤った陽性ではないことを示す。

(2) “プラスの印”が見える。患者はおそらく正の標準の DNA に相補的な非突然変異配列を有し、正の標準のオリゴクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こり、水平線が見える。この試料からの mRNA は標的配列中に少なくとも 1 個の点突然変異を有するので、“プラスの印”的着色が着色反応生成物を示す。

#### 実験例 V

##### mut S 蛋白質によるミスマッチ検出

心臓血清 B (20 mM の KPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.1 mM の EDTA, 1 mM の PMSF, 10 mM の 2-メルカプトエタノール) 中で 1:10 に希釈し、直後に 1.5 × 30 cm の Heparin-Sepharose CL6B (Pharmacia) カラムに 2 ml/分にて適用した。カラムを 0.1 M の KCl を含む 100 ml の緩衝液 B で洗浄し、緩衝液 B 中の KCl の濃度勾配 (0.1 → 0.5 M) を 300 ml 用いて溶離した。100 ml の 3 ml 残分を集めた。試料を還元条件下で 4-20% の SDS-PAGE ゲル上で移動させ、>95% の mut S 蛋白質 (97 kDa) を含む部分をブールした。ブールした部分に 20% の最終濃度までグリセロールを加え、アリコートを -70°C で保存した。

オリゴヌクレオチド Biopolymer Labs からオリゴヌクレオチドを得た。オリゴヌクレオチドの配列は、ヒト β-グロブリン遺伝子中の錐状赤血球突然変異の部位の通りの 30 基基からとった。オリゴヌクレオチドをニトロセルロースフィルターに固定するため、5'-25mer ポリ-C “尾部” 及び 5' アミノ修飾基を有する選ばれたオリゴヌクレオチドを調製した。これらの実験で用いた配列を表 2 に示す。(記：実際の錐状赤血球突然変異は A : T → T : A トランスバージョンである。) オリゴヌクレオチドを種々の組み合わせでアニーリングし、G : T, A : C 及び G : C ミスマッチ、(野生型配列を有するオリゴヌクレオチドを 1 個の塩基の付加又は欠失突然変異を有するオリゴヌクレオチドにアニーリングした場合に形成されるような) 1 個の不対塩基を有するヘテロ 2 本鎖、及び 2 個の異なるホモ 2 本鎖、すなわち完全に相補的な 2 本鎖を形成した。アニーリング条件は下記に記載する。

第一-mut S 抗体 ポリクローナル第一-mut S 抗体は、ニュージー

##### 材料及び方法

細胞 mut S 発現プラスミド pMS312 (Su and Modrich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5057, 1986) の導入により 1.2 L (ラムダ c1857 N1 ΔH kill) を mut S 過剰生産細胞とした。

mut S の精製、mut S 精製液は、Su 及び Modrich (同上) により記載された方法の修正版である。1.2 L (pMS312) 細胞を 50 μg/ml のアンビシリソを含む 8 リットルの B69 培地 (10 g/l の Bacto-Tryptone (Difco)、5 g/l の酵母抽出物 (Difco)、5 g/l の NaCl) 中の 30°C にて OD<sub>600</sub> = 1.3-1.8 まで育成した。培養物を 60°C にて子備加温した B69 培地中で 1:2 に希釈し、42°C で 5 時間インキュベートした。培養物を冷却し、遠心により細胞を吸収し、細胞ペーストを -70°C で保存した。細胞ペースト (15-29 グラム) を氷上で解凍し、細胞を等体积の緩衝液 A (20 mM の KPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 1 mM の EDTA, 1 mM の PMSF, 10 mM の 2-メルカプトエタノール) に再懸濁した。細胞を水アセトン浴中の電波処理によりライシスした。ライセートを遠心により透明とした (40,000 g : 30 分)。上澄み液を緩衝液 A 中の 25% (w/v) のストレプトマイシンサルフェート 1/4 体積で処理し、4°C で 45 分間復性した。不溶性物質を遠心により除去した (40,000 g : 30 分)。硫酸アンモニウム (上澄み液 1 ml 当たり 0.2 g) を 15 分間かけて加え、氷冷液を 4°C にてさらに 40 分間復性した。遠心により沈殿をを集め (40,000 g : 30 分)、10 ml の緩衝液 A に再懸濁した。1 ml の留分を 0.025 M の KCl を含

む緩衝液 B (20 mM の KPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.1 mM の EDTA, 1 mM の PMSF, 10 mM の 2-メルカプトエタノール) 中で 1:10 に希釈し、直後に 1.5 × 30 cm の Heparin-Sepharose CL6B (Pharmacia) カラムに 2 ml/分にて適用した。カラムを 0.1 M の KCl を含む 100 ml の緩衝液 B で洗浄し、緩衝液 B 中の KCl の濃度勾配 (0.1 → 0.5 M) を 300 ml 用いて溶離した。100 ml の 3 ml 残分を集めた。試料を還元条件下で 4-20% の SDS-PAGE ゲル上で移動させ、>95% の mut S 蛋白質 (97 kDa) を含む部分をブールした。ブールした部分に 20% の最終濃度までグリセロールを加え、アリコートを -70°C で保存した。

##### 結果

##### 溶液中でアニーリングされたヘテロ 2 本鎖中のミスマッチの検出

図 4 に示されているデータは、G : T 及び G : G 合成ヘテロ 2 本鎖が mut S 蛋白質により検出されることを示す。検出は mut S に依存しており、ヘテロ 2 本鎖 DNA と競争することができるがホモ 2 本鎖 DNA と競争しない。A : C ミスマッチ及び 1 個の不対塩基を有するヘテロ 2 本鎖の場合にも同様の結果が得られた (データは示さない)。

##### 固定オリゴヌクレオチドへのアニーリング

“テイリングされた (tailed)” オリゴヌクレオチドをフィルター上にスポットし、30mer のオリゴヌクレオチドをそれにアニーリングした。結果 (図 5) は溶液中でアニーリングすることにより調製したヘテロ 2 本鎖の場合に得た結果 (図 4) と同一である。ホモ 2 本鎖 (固定オリゴヌクレオチドの 30mer 部分と正確に相補的な 30mer オリゴヌクレオチドを用いて形成した) は検出されなかった。

##### 純粋オリゴヌクレオチドの存在下のアニーリング

相補的 30mers をアニーリングすることによりホモ 2 本鎖を調製した。その後 “テイリングされた” オリゴヌクレオチドを加え、ホモ 2 本鎖を変性し、混合物を再アニーリングした。試料をフィルター上にスポットした。図 6 はそのような条件下で G : T ミスマッチが検出される

特表平7-500493 (17)

ことを示し、“テイリングされた”オリゴヌクレオチドが複数のオリゴヌクレオチドに関して 30mers と有効に競争することを示している。そのような条件は、突然変異検出検定で用いられる条件と一致している。そのような検定では、試料 DNA は制限酵素により切断されるか（ゲノム DNA の場合）、又は PCR により複製される。いずれの場合も DNA は 2 本鎖であり、従ってプローブとして用いられるテイリングされたオリゴヌクレオチドと同一でそれと競争することができる配列を含んでいる。

図 4 に示されている結果は以下の要領で行われた実験から得た：

等量のオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによりヘテロ 2 本鎖及びホモ 2 本鎖を調製した。“テイリングされた”オリゴヌクレオチドは 5 本基長なのでほとんど 2 倍過剰の 30mers があり、すべての“テイリングされた”オリゴヌクレオチドが 2 本鎖となる傾向が増加する。TNE (10 mM のトリス、pH 8.0、0.1 M の NaCl、1 mM の EDTA) 中の 5 μg (50 μl 中) のそれぞれのオリゴヌクレオチドを混合し、70°C に 10 分間加熱し、30 分間室温に冷却し、水上で冷却した。アニーリングされた分子 (2 μl 中 1 μl) を 25 mM のニトロセルロース膜 (孔径 0.45 ミクロン、Scleicher und Schuell) 上にスポットした。第 1 (抗-mut S) 及び第 2 抗体ならびにアルカリ性ホスファターゼ活性系のための正の標準として 10 ng の精製 mut S をフィルター上にスポットした。フィルターを空気乾燥し、2 ml の反応緩衝液 (20 mM のトリス、pH 7.4、0.01 mM の EDTA、0.5 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.01 mM の DTT) 及び 3% (w/v) 無脂肪乾燥乳を含む 6 ウェルの組織培養

板 (Falcon) に移し、覆いかぶさりながら 4°C で过夜インキュベートした。フィルターを冷反応緩衝液 (4 × 2 ml) で洗浄し、1 本鎖結合蛋白質 (Promega) 検波 (反応緩衝液中 100 μg/ml にて 1 ml) と共にインキュベートした (4°C で 30 分間)。フィルターを冷反応緩衝液 (4 × 2 ml) で洗浄し、(1) 1 ml の反応緩衝液、(1) 1 ml の反応緩衝液及び 10 μg/ml の mut S、又は (1) 1 ml の反応緩衝液及び 10 μg/ml の mut S 及び 1 μg/ml の上記の通りにアニーリングしたホモ 2 本鎖又はヘテロ 2 本鎖 30mers と共にインキュベートした (4°C で 30 分間)。フィルターを冷反応緩衝液 (4 × 2 ml) で洗浄し、抗-mut S 抗体 (反応緩衝液及び 3% の無脂肪乾燥乳中 50 μg/ml にて 2 ml) と共にインキュベートした (4°C で 2 時間)。フィルターを冷反応緩衝液 (4 × 2 ml) で洗浄し、アルカリ性ホスファターゼに共役させたヒツジ抗ウサギ IgG (Bio-Rad) の 1 : 1000 希釈 (反応緩衝液及び 3% の無脂肪乾燥乳中) 2 ml と共にインキュベートした (4°C で 1 時間)。フィルターを冷反応緩衝液 (4 × 2 ml) で洗浄し、2 ml の新しい調節緩衝液 (100 mM のトリス、pH 9.5、100 mM の NaCl、5 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.165 mg/ml のプロモクロロイソイルホスフェート (ジメチルホルムアミド中の保存液から 1 : 100 に希釈)、0.33 mg/ml のニトロブルーテトラゾリウム (ジメチルホルムアミド中の保存液から 1 : 100 に希釈) ) 及びインキュベートした (室温で 10~20 分間)。フィルターを水で数回洗浄し、反応を止めた。

図 5 に示されている結果は、以下の要領で行われた実験から得た：

1 μg (2 μ) の“テイリングされた”オリゴヌクレオチドをニトロセルロースフィルター上にスポットした。フィルターを空気乾燥し、2 ml の TNE を含む 6 ウェル板に移した。2 μg (4 μl) の 30mers オリゴヌクレオチドを加えた。板を 70°C の水浴中に 10 分間浮かせ、直後に 30 分間インキュベートし、水上に置いた。その後フィルターを、図 4 に示す結果と同様して上記に記載した通りに処理した。

図 6 に示されている結果は、以下の要領で行われた実験から得た：

等量の 30mer オリゴヌクレオチドを図 4 に対する説明中に記載の通りにアニーリングした。等数の“テイリングされた”オリゴヌクレオチドを加え、混合物を 85°C に 10 分間加熱し、その後室温で 30 分間インキュベートした。その後の段階はすべて図 4 に対する説明中に記載の通りである。

アニーリングを容易にするために、1 本鎖 DNA 結合蛋白質の代わりに rec A 蛋白質を用いることができるこことを指摘しなければならない。

表 2

オリゴヌクレオチド配列

1) *ccc...ccgcacctgactcctggggacaactctggcg	突然変異体 <sup>1</sup>
2) *ccc...ccgcacctgactcctggggacaactctggcg	野生型
3) CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACCGCA	野生型
4) CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACCGCA	突然変異体
5) CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACCGCA	突然変異体
6) CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACCGCA	突然変異体 (+1 基)

\* - 5' アミノ修飾基

1 - ポリ C 尾部及び 5' アミノ修飾基なしでも調製

表 2 への凡例

オリゴヌクレオチドアニーリング	配列番号
1 + 3 = G : T ミスマッチ	1) SEQ ID #1
1 + 4 = G : G ミスマッチ	2) SEQ ID #2
1 + 5 = ホモ 2 本鎖	3) SEQ ID #3
1 + 6 = 付加／欠失ヘテロ 2 本鎖	4) SEQ ID #4
2 + 3 = ホモ 2 本鎖	5) SEQ ID #5
2 + 5 = A : C ミスマッチ	6) SEQ ID #6

同等性

ここで本発明を完全に記載したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、及び不必要な実験を行うことなく同等のパラメーター、濃度及び条件の広い範囲内で同一のことが行えることは、当該技術分野における熟練者にわかるであろう。

本発明をその特定の態様に拘泥して記載してきたが、さらに修正が可能であることは理解されるであろう。本出願は、一般に本発明の原理に基づき、本発明に関する技術内で既知の又は通常行われる実行に含まれ、添付請求の範囲内に示す通り前記に示されている必須の特徴に適用することができる本開示からのずれを含むいずれの変更、利用又は適用も含むものとする。

配列番号：1

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：DNA

配列

```
CCCCCGCACC TGACTCCTGC CGAGAACTCT
GCCGT
```

配列番号：2

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：DNA

配列

```
CCCCCGCACC TGACTCCTGA CGACAACTCT
GCCGT
```

配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：DNA

配列

```
CGTGGACTGA GGACTCCTCT TCAGACGGCA
```

配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：DNA

配列

```
CGTGGACTGA GGACCCCTCT TCACACGGCA
```

配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

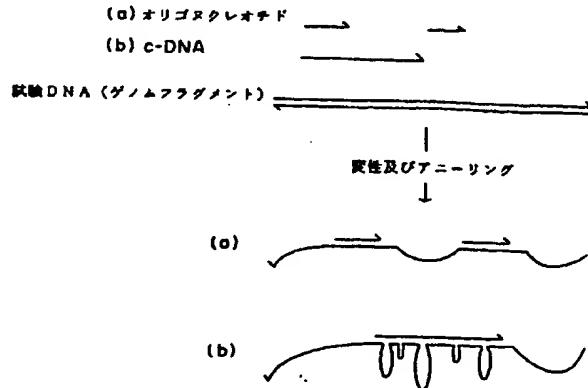
トポロジー：直線状

配列の種類：DNA

配列

```
CGTGGACTGA GGACCCCTCT TCAGACGGCA
```

突然変異の存在に關して調べるべきDNAハイブリットの略図



ミスマッチ含有DNAハイブリットの略図

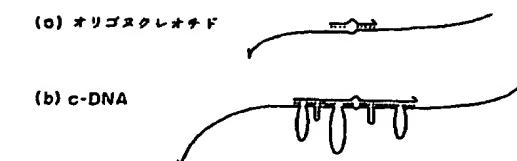


FIG. 1

特表平7-500493 (18)

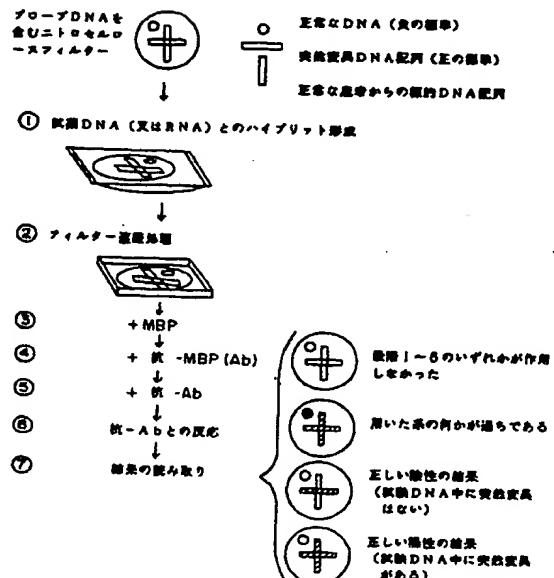


FIG. 3

FIG. 2

FIG. 4A

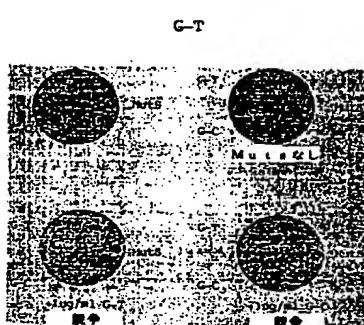


FIG. 4B

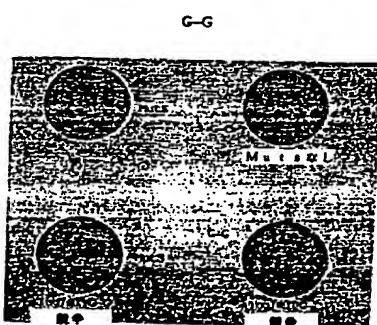


FIG. 5

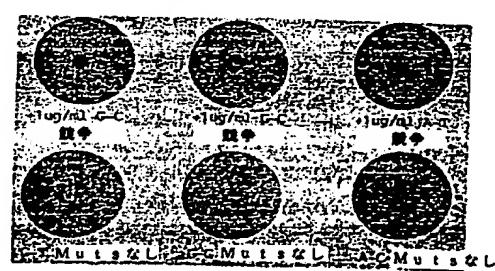
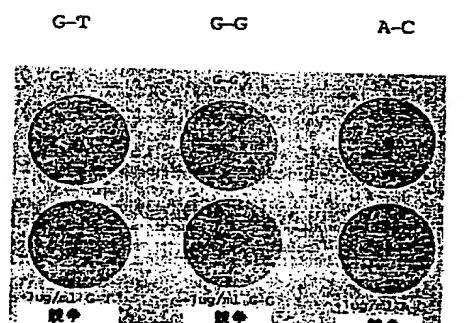
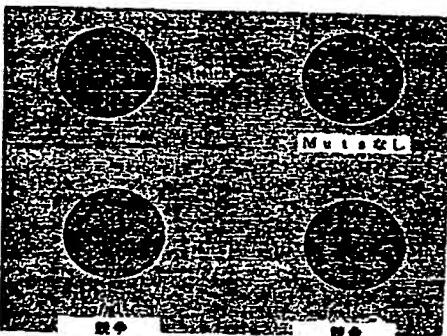


FIG. 6



I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/US 92/06045	
Assignee is International Patent Office (WIPO) or its National Committees and/or Int. Cl. 5 C12Q1/60			
II. FIELDS OF SEARCH		Molecular Devices Corporation International Chemotherapy Drugs Chemotherapy, Cancer	
Int. Cl. 5		C12Q	
Relevant documents other than International Publications in the European Patent Office are indicated in the fields below.			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*		Category / Class of Document, H, with indication, where appropriate, of the relevant subject	
Y GB-A-2 379 235 (LIFECODES CORPORATION) 13 March 1987 see page 3, line 8 - line 82; claims		Reference to Class No. 1-6	
Y NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 16, no. 18, 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 7049 - 7053 J. FRICKE ET AL. "Mismatch-containing oligonucleotide duplex bound by the E. coli mutS-coded protein" cited in the application see the whole document, especially the abstract		1-6 --/--	
<p>* General categories of cited documents : -      - A document relating to the general state of the art which is not      cited in the application for examination      - A document which may prove useful in understanding      the application or which may suggest further work      to be done by the applicant      - A document which may form the basis for patentability or      non-patentability of the application      - A document which may indicate what the patent office should      consider when examining the application      - A document relating to an event, discovery, use, addition or      treatment published prior to the international filing date but      which has not entered the public domain</p> <p>** Other documents published after the international filing date      of a patent application which are cited in the application      - A document which may prove useful in understanding the      application or which may suggest further work      to be done by the applicant      - A document of particular relevance for examination      which is cited in the application or which may indicate      what the patent office should consider when examining the      application      - A document of particular relevance which is cited in the      application or which may indicate what the patent office      should consider when examining the application</p> <p>** Document number of the cited document</p>			
IV. CERTIFICATE		Date of the First Completion of the International Search 13 NOVEMBER 1992	
		Date of Filing of the International Application 21 DECEMBER 1992	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Examiner of International Office LUZZATTO E.R.	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		International Application No. PCT/US 92/06045	
Category / Class of Document, H, with indication, where appropriate, of the relevant subject		Reference to Class No.	
A EP-A-0 310 251 (MOLECULAR DEVICES CORPORATION) 5 April 1989 cited in the application see page 2, line 40 - line 52; claims		1-6-12	

International Patent Office (WIPO) 11/11/92			
This entry lists the patent family members related to the patent application cited in the above-mentioned International search report. The numbers are to be understood as European Patent Office EPO file no. The European Patent Office is not liable for those portions which are merely given for the purpose of information. 11/11/92			
Patent document date in search report	Publication date	Patent document date	Publication date
GB-A-2179735	11-03-87	US-A- 4786075 DE-A- 2053148 DE-A- 3428190 FR-A- 2565705 JP-A- 62158499	07-12-88 02-03-87 08-03-87 06-03-87 14-07-87
EP-A-0310251	05-04-89	US-A- 4978808 DE-A- 2918200 ES-A- 4963558 ES-A- 5011770	10-12-90 12-03-90 16-10-90 30-04-91

\* For more details about this entry see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92